

جهش‌های ژرم‌لاین اگزون‌های ۱۷ و ۱۸ پروتوآنکوژن RET در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید در جمعیت ایرانی

چکیده

دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۱۸ ویرایش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۸ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۲۷ آنلاین: ۱۳۹۵/۱۲/۲۸

زمینه و هدف: سرطان تیروئید شایع‌ترین سرطان غدد درون‌ریز می‌باشد. ۱۰-۵٪ کل انواع سرطان‌های تیروئید را سرطان مدولاری تیروئید تشکیل می‌دهد. وجود جهش‌های پروتوآنکوژن RET به‌ویژه در اگزون‌های ۱۰ و ۱۱ و ۱۶ در ایجاد سرطان مدولاری تیروئید به‌خوبی نشان داده شده است. بنابراین، شناسایی جهش‌های این ژن امکان تشخیص زود هنگام بیماری را برای افرادی که علائم بیماری را بروز نداده‌اند، ایجاد می‌کند. هدف از مطالعه حاضر، تعیین جهش اگزون‌های ۱۷ و ۱۸ پروتوآنکوژن RET در افراد مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید و اعضای درجه یک خانواده آنان در جمعیت ایرانی بود.

روش بررسی: مطالعه حاضر بر روی ۳۱۱ نفر (۱۹۰ بیمار و ۱۲۱ نفر اعضای خانواده آن‌ها) به‌روش نمونه‌گیری ساده با تشخیص پاتولوژی و ارجاع به پژوهشکده غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد (مهرماه ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۴). محتوای DNA ژنومی با روش استاندارد نمک اشباع/پروتئینازکا استخراج شد. تعیین جهش اگزون‌های ۱۷ و ۱۸ پروتوآنکوژن RET با استفاده از روش PCR-Sequencing انجام شد.

یافته‌ها: تعداد ۲۰ جهش بدمعنی در کدون ۹۸۲ شامل CGC>TGC (rs17158558) p.Arg982Cys، اگزون ۱۸ پروتوآنکوژن RET یافت گردید، از این تعداد، ۱۶ جهش هتروزیگوت و چهار جهش هموزیگوت بودند. همچنین، ۱۵۴ تغییر نوکلئوتیدی G>A (rs2742236) در اینترون ۱۸ و چهار تغییر نوکلئوتیدی C>T (rs370072408) در اینترون ۱۷ مشاهده شد. در اگزون ۱۷ جهشی یافت نگردید.

نتیجه‌گیری: از آنجایی‌که جهش یافت شده در کدون ۹۸۲ اگزون ۱۸، جز جهش‌های بدمعنی بوده و منجر به تغییر اسیدآمیننه آرژینین به سیستئین در ساختار پروتئین تیروزین‌کیناز RET می‌گردد و همچنین با توجه به امتیاز SIFT(0.01) و Polyphen(0.955) این جهش، می‌توان آنرا جز جهش‌های خطرناک در نظر گرفت. از طرفی چون فراوانی این جهش در بین بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید در این مطالعه ۷۴٪ محاسبه گردید، از این‌رو در صورت تایید پاتوژن بودن این جهش، احتمالاً بررسی اگزون ۱۸ نیز جز آزمایش ژنتیکی غربالگری RET مدنظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سرطان مدولاری تیروئید، جهش ژرم‌لاین، پروتوآنکوژن RET.

مرجان ظریف یگانه^۱، سمیرا کبیری^۲
سارا شیخ‌الاسلامی^۱، حسنا حسان
منش^۲، مهدی هدایتی^{*۱}

۱- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی غدد درون‌ریز، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۲- گروه زیست‌شناسی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آذربایجان شرقی، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، تهران، ایران.
تلفن: ۰۲۱-۲۲۴۳۵۰۰
E-mail: hedayati@endocrine.ac.ir

مقدمه

مدولاری تیروئید (Medullary thyroid carcinoma, MTC) توموری بدخیم، برگرفته از سلول‌های پارافولیکولار C بوده و ۱۰-۵٪ کل انواع سرطان‌های تیروئید را شامل می‌شود.^{۱،۲} سرطان مدولاری تیروئید به دو صورت تک‌گیر (Sporadic) ۷۵٪ و ارثی (Hereditary) ۲۵٪

سرطان تیروئید شایع‌ترین تومور بدخیم سیستم اندوکرین می‌باشد و حدود ۱٪ تمامی سرطان‌ها در انسان را شامل می‌شود.^۱ سرطان

مانند تیروئیدکتومی ندارند.^{۹،۱۰} از آنجایی که تاکنون در ایران مطالعه‌ای در زمینه بررسی جهش در اگزون‌های ۱۷ و ۱۸ پروتوآنکوژن RET صورت نگرفته است،^{۱۷-۲۲} مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی جهش‌های ژرم‌لاین اگزون ۱۷ و ۱۸ پروتوآنکوژن RET در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید در جمعیت ایرانی به انجام رسید.

روش بررسی

غربالگری ژنتیکی جهش‌های پروتوآنکوژن RET به منظور مدیریت بهینه در درمان بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید و پیشگیری از بروز این بیماری در اعضای خانواده بیماران، از سال ۱۳۸۰ تاکنون در پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (به‌عنوان یک مرکز ارجاعی) در حال اجرا می‌باشد. مطالعه توصیفی-مقطعی حاضر نیز بخشی از پروژه تحقیقاتی در زمینه بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید در این مرکز بود (مهرماه ۱۳۹۲ تا ۱۳۹۴).

جمعیت مورد مطالعه در این پژوهش شامل ۳۱۱ نفر از بیماران و خویشاوندان درجه اول آن‌ها به روش نمونه‌گیری آسان انتخاب شدند. این افراد به صورت داوطلبانه و پس از تکمیل فرم رضایت‌نامه وارد مطالعه شدند که از این تعداد ۱۹۰ بیمار و ۱۲۱ نفر از اعضای درجه اول خانواده آن‌ها بودند.

بررسی ژنتیکی: پس از تهیه ۱۰ ml خون محیطی از افراد، DNA ژنومی به روش نمک اشباع/پروتیناز کا استخراج شد. برای تکثیر اگزون‌های ۱۷ و ۱۸ با استفاده از روش PCR از پرایمرهای اختصاصی (3'-GTCCCACGAGGCTCAGAGAT-5' و 5'-CCTCCCATGCCTGTCTGTAG-3') برای اگزون ۱۸ و پرایمر (3'-CTCCCCACCTTCATGCTAC-5' و 5'-CCTCCCTAAGTGCCTGCTG-3') برای اگزون ۱۷ استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۳۵ µl با شرایط زیر انجام گرفت: Tag DNA Polymerase (0.5 U)، Tris-HCl pH=9 (5.75، dNTP (142.85 µm)، MgCl₂ (0.85 Mm)، KCl (17.14 Mm)، Mm) ۱ µl از پرایمرهای رفت و برگشت (۱۰ pmol/µl)، نمونه DNA (۱۰۰ ng/µl) و ۳۲ µl آب مقطر استریل. واکنش در ترموسایکلر اتوماتیک انجام شد (peqSTAR 96X HP, Peclab Co, Germany) شرایط PCR برای

می‌باشد. نوع ارثی به سه صورت سندرم نئوپلازی اندوکراین چندگانه (Multiple endocrine neoplasia type 2) MEN2A، MEN2B و سرطان مدولاری تیروئید خانوادگی (Familial MTC, FMTC) است.^{۴،۵} سرطان مدولاری تیروئید ارثی به وسیله جهش‌های ژرم‌لاین در پروتوآنکوژن RET ایجاد می‌شود، جهش‌های سوماتیکی این ژن در سرطان مدولاری تیروئید تک‌گیر دخالت دارد.^۶ نوع ارثی این بیماری دارای الگوی وراثتی اتوزوم بارز با نفوذ متغیر و وابسته به سن می‌باشد.^{۷،۸}

پروتوآنکوژن RET در ناحیه کروموزومی 10q11.21 قرار گرفته و دارای ۲۱ اگزون است. این ژن یک گیرنده‌ی تیروزین کیناز غشایی را رمز می‌کند که در انتقال سیگنال‌های رشد و تمایز سلول دارای اهمیت است. نقش این ژن در فرآیند تکامل جنین به ویژه تکامل کلیه و سلول‌های منشاء گرفته از ستیغ عصبی مشخص شده است.^{۱۰،۱۳،۱۴} گیرنده RET دارای ناحیه‌ای غنی از سیستین و چهار جایگاه شبه کادهرین و یک جایگاه اتصال به کلسیم در بخش خارج سلولی، و بخش تیروزین کینازی در داخل سلول و یک ناحیه داخل غشایی، می‌باشد. با اتصال لیگاندهایی مانند Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) به این گیرنده، دو ناحیه کاتالیتیکی آن کنار هم قرار گرفته، پروتیین RET دایمر شده و سپس ترانس فسفوریلاسیون واحدهای تیروزین آن روی می‌دهد که باعث انتشار سیگنال به داخل سلول می‌گردد.^{۱۱-۱۴}

از بین رفتن عملکرد پروتوآنکوژن RET منجر به ایجاد بیماری‌هایی مانند هیرشپرونک و افزایش فعالیت آن باعث ایجاد سرطان می‌شود.^{۱۰،۱۳} از آنجایی که RET یک پروتوآنکوژن است، جهش در یک آلل آن برای ایجاد تغییرات نئوپلاستی کفایت می‌کند.^۴ شایعترین جهش‌ها در ژن RET در کدون‌های سیستینی ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸ و ۶۲۰ (اگزون ۱۰) و ۶۳۰، ۶۳۴ (اگزون ۱۱) و برخی کدون‌های غیر سیستینی مثل کدون ۸۰۴ (اگزون ۱۴)، ۸۸۳ (اگزون ۱۵) و ۹۱۸ (اگزون ۱۶) یافت شده و احتمالاً قدرت آنکوژنی متفاوت جهش‌های RET به جایگاه تغییر اسید آمینه بستگی دارد که باعث ایجاد فنوتیپ‌های گوناگون در سرطان مدولاری تیروئید می‌شود.^{۱۵-۱۸} بررسی‌های ژنتیکی به‌ویژه برای اعضا درجه اول بیماران مهم است. اگر در اعضا درجه اول آن‌ها جهش دیده نشود احتمال بروز بیماری در آن‌ها مانند جمعیت عادی بوده و نیازی به انجام اقدامات پیشگیرانه

ژن RET نیز تعیین جهش شده بودند (اگزون‌های ۱۰، ۱۱، ۱۶) و پس از مقایسه داده‌های اگزون ۱۸، مشخص شده که تمامی افراد دارای جهش در کدون ۹۸۲، دارای هاپوتایپ G691S/S904S (اگزون‌های ۱۱/۱۵) بودند. همچنین در این افراد، تعداد هفت جهش Hotspot به ترتیب شامل: یک مورد C620G (اگزون ۱۰)، یک مورد C630Y (اگزون ۱۱)، سه مورد C634F (اگزون ۱۱) و دو مورد R886Q (اگزون ۱۵) شناسایی گردید.

تغییر نوکلئوتیدی G>A در اینترون ۱۸ (rs2742236) با فراوانی آلی ۷۱٪ برای آلل G و ۲۹٪ برای آلل A در ۸۹ بیمار و ۶۵ نفر از اعضای خانواده شناسایی گردید. همچنین چهار تغییر نوکلئوتیدی C>T (rs370072408) در سه فرد بیمار و نفر از اعضای خانواده و دو تغییر نوکلئوتیدی A>G (rs72781242) نیز در اینترون ۱۷، تنها در اعضای خانواده بیماران یافت گردید.

بحث

در پژوهش حاضر در اگزون ۱۸ ژن پروتوآنکوژن RET تعداد ۲۰ جهش بدمعنی در کدون ۹۸۲ این ژن شناسایی شد، این جهش منجر به تغییر اسیدآمینه آرژینین به سیستئین شده که طی آن آلل C به T تبدیل می‌شود (CGC 982 TGC). از این تعداد جهش، هشت جهش در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تک‌گیر، پنج جهش در بیماران سرطان مدولاری خانوادگی و هفت جهش در اعضای خانواده بیماران بود. در اگزون ۱۷ این ژن نیز جهشی یافت نگردید.

جهش‌های سوماتیک و ژرم‌لاین پروتوآنکوژن RET در ایجاد سرطان مدولاری تیروئید به خوبی شناخته شده است.^{۲۳} تاکنون مطالعات زیادی بر روی اگزون‌های ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶ این ژن صورت گرفته است که جهش‌های ژرم‌لاین اگزون‌های ۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۴ و ۱۵ RET بیش از سایرین در بروز سندرم‌های نئوپلازی چندگانه درون‌ریز نوع A و سرطان مدولاری خانوادگی موثر بوده است.^{۲۴}

در واقع، بیشترین جهش‌های بدمعنی در نئوپلازی چندگانه درون‌ریز نوع A و سرطان مدولاری خانوادگی در توالی‌های سیستئینی حفاظت شده در کدون‌های ۶۰۹، ۶۱۱، ۶۱۸، ۶۲۰ (اگزون ۱۰) و کدون‌های ۶۳۰ یا ۶۳۴ (اگزون ۱۱) و یا در ناحیه

اگزون ۱۸ شامل ۳۰ چرخه دمایی °C ۹۴ به مدت ۱۰ دقیقه برای دناتوراسیون اولیه، دمای °C ۹۴ به مدت ۴۵ ثانیه برای دناتوراسیون دوم، دمای °C ۶۰ به مدت ۴۵ ثانیه برای اتصال پرایمرها، °C ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه برای تکثیر و °C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر نهایی بود.

شرایط PCR برای اگزون ۱۷ شامل ۳۰ چرخه دمایی °C ۹۴ به مدت ۱۰ دقیقه برای دناتوراسیون اولیه، دمای °C ۹۴ به مدت ۴۵ ثانیه برای دناتوراسیون دوم، دمای °C ۶۲/۳ به مدت ۴۵ ثانیه برای اتصال پرایمرها، °C ۷۲ به مدت یک دقیقه برای تکثیر و °C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر نهایی بود. به منظور رویت قطعات، از رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده گردید و نمونه‌های مناسب جهت تعیین ژنوتایپ، تعیین توالی شدند. کروماتوگرام‌های سکانس به‌منظور مقایسه با سکانس ژن رفرانس از Chromas software, version 2.33 استفاده شد. (www.technelysium.com.au/chromas.html) استفاده شد.

یافته‌ها

جمعیت مورد مطالعه شامل ۳۱۱ نفر بود (۱۷۰ زن و ۱۴۱ مرد) که از این تعداد ۱۹۰ نفر مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید و ۱۲۱ نفر اعضا درجه اول بیماران بودند. از ۱۹۰ فرد بیمار، ۱۰۶ بیمار زن و ۸۴ بیمار مرد بودند. از ۱۲۱ نفر اعضا خانواده بیماران نیز ۶۴ نفر زن و ۷۵ نفر مرد بودند. از ۱۹۰ فرد مبتلا ۳۴ نفر سرطان مدولاری خانوادگی و هفت نفر نئوپلازی چندگانه درون‌ریز نوع A، سه نفر نئوپلازی چندگانه درون‌ریز نوع B، یک نفر فنوکروموسیتوما و ۱۴۵ نفر مبتلا به سرطان مدولاری تک‌گیر بودند. میانگین سنی در این جمعیت ۳۴/۵±۱۵/۲ سال و حداکثر سن ۷۱ سال و کمترین سن یک سال بود.

در جمعیت مورد بررسی، تعداد ۲۰ جهش بدمعنی در کدون ۹۸۲: (rs:17158558) p.Arg982Cys, c.2944C>T, CGC>TGC یافت گردید که ۱۳ مورد از این جهش‌ها در بیماران و هفت مورد آن‌ها در اعضای خانواده آنان مشاهده شد. از این تعداد پنج مورد در زنان و ۱۵ مورد در مردان بود. در اگزون ۱۷ نیز جهشی مشاهده نشد. فراوانی آلی برای آلل نرمال در کدون ۹۸۲، ۹۶٪ و برای آلل جهش یافته در این کدون، ۴٪ بود. در گروه مورد بررسی، اگزون‌های اصلی

جدول ۱: انواع جهش‌های گزارش شده در اگزون‌های ۱۷ و ۱۸ پروتوآنکوژن RET^{۳۰-۳۷}

اگزون‌ها	اریانت	نوع جهش	تغییر اسید آمینه	کدون	فنتوتایپ مرتبط
	COSM3437797, COSM3437798	اریانت بد معنی	Ser/Phe	۹۳۶	کارسینوما پوست
	rs780967888	اریانت هم‌معنی	Leu/Leu	۹۴۰	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
	rs747696868	اریانت هم‌معنی	Leu/Leu	۹۴۱	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
	KinMutBase_RET_DNA:g.47631G>A, CM951129	ایجاد کدون پایان	Trp/*	۹۴۲	بیماری هیرشپرونک
	KinMutBase_RET_DNA:g.47632G>C, CM001787	اریانت بد معنی	Trp/Cys	۹۴۲	Aganglionsis, total colonic
	CI094261	درج شدگی	GCTGTG^(943)GAGggagATCG	۹۴۳	بیماری هیرشپرونک
	rs794728686	اریانت بد معنی	Ile/Ser	۹۴۴	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
	COSM3437800	اریانت هم‌معنی	Ile/Ile	۹۴۴	کارسینوما روده بزرگ، ملانوما بدخیم
	COSM1675176, COSM1675177	اریانت بد معنی	Ile/Met	۹۴۴	کارسینوما کلیه
	COSM3437799, rs755606269	اریانت هم‌معنی	Ile/Ile	۹۴۴	کارسینوما روده بزرگ، ملانوما بدخیم
	rs587780811, COSM5095531, COSM5095530	اریانت بد معنی	Val/Met	۹۴۵	Thymoma
	rs794728687	اریانت بد معنی	Thr/Ile	۹۴۶	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
	rs794728691	تغییر در چارچوب خوانش	c.2839del C (Leu/X)	۹۴۷	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
	rs749196396	اریانت هم‌معنی	Gly/Gly	۹۴۸	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
	rs794728689	تغییر در چارچوب خوانش	c.2846delG (Gly/X)	۹۴۹	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
اگزون شماره ۱۷	rs770639985	اریانت بد معنی	Asn/Ile	۹۵۰	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
	COSM5212496	حذف و تغییر در چارچوب خوانش	P951fs*	۹۵۱	سرطان پستان
	COSM5212495	حذف	c.2850_2856delCCCCTAT, P951fs*12	۹۵۱	سرطان پستان
	COSM5140267, COSM5140266	اریانت بد معنی	Pro/Ala	۹۵۱	تومور روده بزرگ
	CM119579	اریانت بد معنی	Pro/Leu	۹۵۳	بیماری هیرشپرونک
	CM033980	اریانت هم‌معنی	Gly/Gly	۹۵۴	بیماری هیرشپرونک
	CI951972	درج شدگی	ATCCT^(954)GGGATTTCC	۹۵۴	بیماری هیرشپرونک
	rs587778658, COSM918126, COSM1584948	اریانت بد معنی	Arg/Trp	۹۵۹	بدخیمی روده بزرگ، اندومتزیوم
	rs745650861, COSM1223555	اریانت بد معنی	Arg/Gln	۹۵۹	بدخیمی روده بزرگ
	CM033981	اریانت بد معنی	Ph/Leu	۹۶۱	بیماری هیرشپرونک
	rs369804828	اریانت بد معنی	Asn/Ser	۹۶۲	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
	rs772329940	اریانت هم‌معنی	Asn/Asn	۹۶۲	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
	rs533682776	اریانت هم‌معنی	Leu/Leu	۹۶۴	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
	rs760765930	اریانت بد معنی	Thr/Ile	۹۶۶	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
	COSM80440, rs373693875	اریانت هم‌معنی	Thr/Thr	۹۶۶	بدخیمی تخمدان
	rs777007074	اریانت بد معنی	Gly/Ser	۹۶۷	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
	rs762448300	اریانت بد معنی	His/Tyr	۹۶۸	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
	CM001788, KinMutBase	اریانت بد معنی	Arg/Trp	۹۶۹	Aganglionsis, total colonic

اگزونها	واریانت	نوع جهش	تغییر اسید آمینه	کدون	فنتوتایپ مرتبط
اگزون شماره ۱۷	COSM1297245, COSM4721086	واریانت بد معنی	Arg/Gln	۹۶۹	بدخیمی روده بزرگ و دستگاه ادراری
	COSM3978500, COSM3978501	واریانت بد معنی	Arg/Leu	۹۶۹	بدخیمی ریه
	rs76534745, CM941247, KinMutBase_RET_DNA:g.47720A>G	واریانت بد معنی	Arg/Gly	۹۷۲	بیماری هیرشپرونک
	CM941248, KinMutBase_RET_DNA:g.47724C>T	واریانت بد معنی	Pro/Lue	۹۷۳	بیماری هیرشپرونک
	COSM20434	واریانت هم معنی	Asp/Asp	۹۷۴	بدخیمی روده بزرگ
	rs375414982	واریانت بد معنی	Ser/Arg	۹۷۷	نئوپلازی چندگانه درون ریز نوع 2A
	rs758800351	واریانت بد معنی	Glu/Lys	۹۷۸	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
	rs752352085	واریانت بد معنی	Glu/Gly	۹۷۹	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
	KinMutBase_RET_DNA:g.47745T>C, rs794728688, CM962699, COSM1675178, COSM1675179	واریانت بد معنی	Met/Thr	۹۸۰	بدخیمی روده بزرگ
	rs147318495	واریانت هم معنی	Tyr/Tyr	۹۸۱	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
	CM033451, KinMutBase_RET_DNA:g.48824C>T, rs17158558, COSM427546, COSM3997965	واریانت بد معنی	Arg/Cys	۹۸۲	نئوپلازی چندگانه درون ریز نوع 2A، بیماری هیرشپرونک
	rs368550200	واریانت بد معنی	Arg/Leu	۹۸۲	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
	COSM1264016, rs368550200	واریانت بد معنی	Arg/His	۹۸۲	بدخیمی ریه
	COSM1957271, COSM1957272	واریانت بد معنی	Glu/Lys	۹۹۱	بدخیمی روده بزرگ
	CM119580, rs758191409, COSM3665731, COSM3665730	واریانت بد معنی	Pro/Leu	۹۹۲	بیماری هیرشپرونک، تومور کبد
	rs199718928	واریانت بد معنی	Lys/Asn	۹۹۴	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
	rs145798106	واریانت هم معنی	Pro/Pro	۹۹۶	عدم وجود فنتوتایپ مشخص
rs781236624	واریانت بد معنی	Val/Leu	۹۹۷	عدم وجود فنتوتایپ مشخص	
COSM3790782, rs748288493, COSM3790781	واریانت بد معنی	Ala/Glu	۹۹۹	بدخیمی دستگاه ادراری	
rs376487144	واریانت هم معنی	Ala/Ala	۹۹۹	نئوپلازی چندگانه درون ریز نوع 2A	
rs773872326	واریانت بد معنی	Ser/Arg	۱۰۰۲	عدم وجود فنتوتایپ مشخص	
rs763489828, COSM327231	واریانت بد معنی	Ser/Asn	۱۰۰۲	بدخیمی های خونی	
rs370970483	واریانت هم معنی	Ser/Ser	۱۰۰۲	عدم وجود فنتوتایپ مشخص	
rs775993413	حذف شدگی در چارچوب خوانش	Glu, Lys/Glu	۱۰۰۶	عدم وجود فنتوتایپ مشخص	
COSM1584947, COSM918127	واریانت بد معنی	Glu/Asp	۱۰۰۶	بدخیمی اندومتر	
rs774840230	واریانت بد معنی	Lys/Glu	۱۰۰۷	عدم وجود فنتوتایپ مشخص	
rs759798237	واریانت بد معنی	Lys/Met	۱۰۰۷	عدم وجود فنتوتایپ مشخص	
rs786204098	واریانت بد معنی	Lys/Asn	۱۰۰۷	نئوپلازی چندگانه درون ریز نوع 2A	
COSM1187933	واریانت بد معنی	Met/Thr	۱۰۰۸	بدخیمی ریه	
CM109934	واریانت بد معنی	Met/Val	۱۰۰۹	سرطان مدولاری تیروئید	
COSM4014174, rs375213011	واریانت بد معنی	Met/Val	۱۰۰۹	معدده	
COSM4014173	واریانت بد معنی	Met/Val	۱۰۰۹	معدده	
rs368345402	واریانت بد معنی	Lys/Glu	۱۰۱۱	عدم وجود فنتوتایپ مشخص	

سیستین با آرژینین می‌گردد، در افراد مبتلا به بیماری هیرشپرونک وجود دارد.^{۳۸-۴۱} در مطالعه‌ای که توسط Romeo و همکاران بر روی بیماران مبتلا به هیرشپرونک در جمعیت ایتالیا صورت گرفت، تغییر در کدون ۹۷۲ اگزون ۱۷ (rs76534745, AGG>GGG) ژن RET که سبب جانیشینی آرژینین به گلايسين می‌گردد، در این بیماران مشاهده گردید.^{۴۱}

در نتیجه بررسی وجود تغییرات تعداد کپی (CNVs) در برخی از ژن‌های مرتبط با بیماری هیرشپرونک از جمله RET (اگزون‌های ۱-۲۱) در جمعیت اسپانیایی، جهش نقطه‌ای هتروزیگوت در کدون ۹۵۳ c.2859T>A (p.Pro953Lys) اگزون ۱۷ ژن RET شناسایی گردید.^{۴۲} در مطالعه‌ای در فنلاند، جهش‌های جدیدی از جمله Frameshift-introducing insertion 47665insT در اگزون ۱۷ و جهش c.2944C>T (p.Arg982Cys, rs:17158558) در اگزون ۱۸ یافت گردید. دو جهش R982C و 47665insT با علائم بالینی سرطان مدولاری تیروئید ارتباط نداشتند، اما ارتباط آن‌ها با بیماری هیرشپرونک خانوادگی گزارش شده است.^{۴۳} از آنجایی که جهش یافت شده در کدون ۹۸۲ اگزون ۱۸، جز جهش‌های بدمعنی بوده و منجر به تغییر اسیدآمینه آرژینین به سیستین در ساختار پروتیین تیروئین‌کیناز RET می‌گردد و همچنین با توجه به امتیاز SIFT(0.01) (امتیازی جهت پیش‌بینی تغییر اسید آمینه) و Polyphen(0.955) (امتیازی جهت پیش‌بینی، احتمال تاثیر تعویض آمینو اسید در تغییر ساختار و عملکرد پروتیین) این جهش، می‌توان آن را جز جهش‌های خطرناک در نظر گرفت. از طرفی چون فراوانی این جهش در بین بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید در جمعیت مورد بررسی، ۶/۴٪ محاسبه گردید، از این رو در صورت اثبات بیماری‌زا بودن جهش کدون ۹۸۲ (p.Arg982Cys) c.2944C>T، احتمالاً بتوان بررسی ژنتیکی اگزون ۱۸ را نیز جز آزمایش ژنتیکی غربالگری RET مدنظر قرار داد. هر چند این امر به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

سپاسگزاری: هزینه‌های اجرای این پروژه توسط مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تامین شده است. نویسندگان مراتب قدردانی و سپاس خود را از بیماران و خانواده آنان، پزشکان متخصص غدد و همچنین پرسنل محترم آزمایشگاه ژنتیک مولکولی ابراز می‌دارند.

خارج سلولی غنی از سیستئین می‌باشند. همچنین برخی جهش‌ها در کدون‌های غیرسیستین مانند کدون ۸۰۴ اگزون ۱۴، کدون ۸۸۳ اگزون ۱۵ نیز در بیماران سرطان مدولاری خانوادگی و MEN2A مشاهده می‌گردد.^{۲۶،۲۵}

بر اساس داده‌های پایگاه‌های اطلاعاتی dbSNP, Ensembl, genome mutation database (HGMD) تاکنون در اگزون‌های ۱۷ و ۱۸ پروتوآنکوژن RET، تعداد ۶۶ نوع جهش شناسایی شده است،^{۳۷-۳۰} (جدول ۱) که از این تعداد، ۴۴ نوع جهش بدمعنی، ۱۴ نوع جهش خاموش، هفت نوع جهش حذف/اضافه و یک نوع جهش مربوط به کدون پایان زودرس می‌باشند. از این تعداد جهش گزارش شده، تعداد ۴۲ جهش مربوط به اگزون ۱۷ و ۲۴ جهش مربوط به اگزون ۱۸ ژن RET بوده است.^{۳۸،۳۰} (جدول ۱). شایعترین کدون‌های دارای جهش در اگزون ۱۷ شامل کدون ۹۴۴، ۹۵۱، ۹۶۹ و در اگزون ۱۸ کدون‌های ۹۸۲، ۱۰۰۲، ۱۰۰۷ و ۱۰۰۹ می‌باشند. بیشترین تعداد جهش‌های گزارش شده در اگزون‌های ۱۷ و ۱۸ ژن RET در انواع مختلفی از بدخیمی‌ها و پس از آن بیماری هیرشپرونک بوده است.^{۳۶-۳۱} همانگونه که گفته شد در پژوهش اخیر، در اگزون ۱۷ ژن RET در جمعیت مورد بررسی جهشی یافت نگردید. اما در اگزون ۱۸ این ژن و در کدون ۹۸۲ (p.Arg982Cys) c.2944C>T تعداد ۲۰ جهش شناسایی شد. در زمینه بررسی اگزون‌های ۱۷ و ۱۸ ژن RET در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید مطالعات اندکی صورت گرفته است. بر اساس یک پژوهش که توسط Lindsey و همکاران در سال ۲۰۱۲، بر روی ۵۰ بیمار مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید در جمعیت برزیلی صورت گرفت، در نتیجه‌ی آنالیز گسترده ژن RET، پلی‌مورفسمی جدید در اینترون ۱۷، همچنین جهش در کدون ۹۸۲ اگزون ۱۸ (rs17158558) و تغییر نوکلئوتیدی G>A (rs2742236) در اینترون ۱۸ این ژن، در بیماران مبتلا به سرطان مدولاری تیروئید تک‌گیر (که فاقد جهش در اگزون‌های ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۵ یا ۱۶ ژن RET بودند) گزارش گردید.^{۳۷} این درحالی‌است که در مطالعه حاضر، هفت نفر از ۲۰ فرد دارای جهش یافت شده در کدون ۹۸۲ دارای جهش Hotspot در اگزون‌های ۱۰، ۱۱ و ۱۵ بودند. مطالعات نشان داده است جهش c.2944C>T (p.Arg982Cys, rs:17158558) کدون ۹۸۲ در اگزون ۱۸ ژن RET که منجر به جایگزینی توالی

References

- Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2008;8(1):83-95.
- Chang CF, Yang WS, Su YN, Wu IL, Chang TC. Mutational spectrum of multiple endocrine neoplasia type 2 and sporadic medullary thyroid carcinoma in taiwan. *J Formos Med Assoc* 2009;108(5):402-8.
- Marsh DJ, Andrew SD, Eng C, Learoyd DL, Capes AG, Pojer R, et al. Germline and somatic mutations in an oncogene: RET mutations in inherited medullary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1996;56(6):1241-3.
- Ainahi A, Kebbou M, Benabdeljalil N, Fechtali T, Timinouni M, Oufara S, et al. RET proto-oncogene mutation analysis in medullary thyroid carcinoma in Moroccan families: primarily study. *Cong Int Biochimie* 2006;54-7.
- Colombo-Benkman M, Li Z, Riemann B, Hengst K, Herbst H, Keuser R, et al. Characterization of the RET protooncogene transmembrane domain mutation S649L associated with nonaggressive medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2008;158(6):811-6.
- Figlioli G, Landi S, Romei C, Elisei R, Gemignani F. Medullary thyroid carcinoma (MTC) and RET proto-oncogene: mutation spectrum in the familial cases and a meta-analysis of studies on the sporadic form. *Mutat Res* 2013;752(1):36-44.
- Hedayati M, Nabipour I, Rezaei-Ghaleh N, Azizi F. Germline RET mutations in exons 10 and 11: an Iranian survey of 57 medullary thyroid carcinoma cases. *Med J Malaysia* 2006;61(5):564-9.
- Romei C, Elisei R, Pinchera A, Ceccherini I, Molinaro E, Mancusi F, et al. Somatic mutations of the ret protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma are not restricted to exon 16 and are associated with tumor recurrence. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(4):1619-22.
- Kitamura Y, Goodfellow PJ, Shimizu K, Nagahama M, Ito K, Kitagawa W, et al. Novel germline RET proto-oncogene mutations associated with medullary thyroid carcinoma (MTC): mutation analysis in Japanese patients with MTC. *Oncogene* 1997;14(25):3103-6.
- Sippel RS, Kunnimalaiyaan M, Chen H. Current management of medullary thyroid cancer. *Oncologist* 2008;13(5):539-47.
- Bethanis S, Koutsodontis G, Palouka T, Avgoustis C, Yannoukakos D, Bei T, et al. A newly detected mutation of the RET protooncogene in exon 8 as a cause of multiple endocrine neoplasia type 2A. *Hormones (Athens)* 2007;6(2):152-6.
- Cosma MP, Cardone M, Carlomagno F, Colantuoni V. Mutations in the extracellular domain cause RET loss of function by a dominant negative mechanism. *Mol Cell Biol* 1998;18(6):3321-9.
- Grimm J, Sachs M, Britsch S, Di Cesare S, Schwarz-Romond T, Alitalo K, et al. Novel p62dok family members, dok-4 and dok-5, are substrates of the c-Ret receptor tyrosine kinase and mediate neuronal differentiation. *J Cell Biol* 2001;154(2):345-54.
- Lips CJ, Höppner JW, Thijssen JH. Medullary thyroid carcinoma: role of genetic testing and calcitonin measurement. *Ann Clin Biochem* 2001;38(Pt 3):168-79.
- Machens A, Gimm O, Hinze R, Höppner W, Boehm BO, Dralle H. Genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid carcinoma: oncological features and biochemical properties. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(3):1104-9.
- Rauc F, Frank-Rauc K. Genotype-phenotype relationship in multiple endocrine neoplasia type 2. Implications for clinical management. *Hormones (Athens)* 2009;8(1):23-8.
- Yeganeh MZ, Sheikholeslami S, Dehbashi Behbahani G, Farashi S, Hedayati M. Skewed mutational spectrum of RET proto-oncogene Exon10 in Iranian patients with medullary thyroid carcinoma. *Tumour Biol* 2015;36(7):5225-31.
- Hedayati M, Zarif Yeganeh M1, Sheikholeslami S1, Afsari F1. Diversity of mutations in the RET proto-oncogene and its oncogenic mechanism in medullary thyroid cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2016;53(4):217-27.
- Yeganeh MZ, Sheikholeslami S, Hedayati M. RET proto oncogene mutation detection and medullary thyroid carcinoma prevention. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16(6):2107-17.
- Hedayati M, Zarif Yeganeh M, Sheikholeslami S, Daneshpour M, Azizi F. Medullary Thyroid Cancer Screening Using the RET Proto Oncogene Genetic Marker. *Iran J Endocrinol Metab* 2015;17(2):157-70.
- Sheikholeslami S, Zarif Yeganeh M, Hoghooghi Rad L, Golab Ghadaksaz H, Hedayati M. Haplotype frequency of G691S/S904S in the RET proto-oncogene in patients with medullary thyroid carcinoma. *Iran J Publ Health* 2014;43(2):235-40.
- Hedayati M, Zarif Yeganeh M, Sheikhol Eslami S, Rezaghi Barez S, Hoghooghi Rad L, Azizi F. Predominant RET germline mutations in Exons 10, 11, and 16 in Iranian Patients with Hereditary Medullary Thyroid Carcinoma. *J Thyroid Res* 2011;2011:264248.
- Kouvaraki MA, Shapiro SE, Perrier ND, Cote GJ, Gagel RF, Hoff AO, et al. RET proto-oncogene: a review and update of genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors. *Thyroid* 2005;15(6):531-44.
- Zhou Y, Zhao Y, Cui B, Gu L, Zhu S, Li J, et al. RET proto-oncogene mutations are restricted to codons 634 and 918 in mainland Chinese families with MEN2A and MEN2B. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;67(4):570-6.
- Blank RD, Sklar CA, Dimich AB, LaQuaglia MP, Brennan MF. Clinical presentations and RET protooncogene mutations in seven multiple endocrine neoplasia type 2 kindreds. *Cancer* 1996;78(9):1996-2003.
- Hansford JR, Mulligan LM. Multiple endocrine neoplasia type 2 and RET: from neoplasia to neurogenesis. *J Med Genet* 2000;37(11):817-27.
- Human Genome Mutation Database [database on the Internet]. Available from: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/all.php>.
- SNP Database [database on the Internet]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.
- Ensemble [database on the Internet]. Available from: [www.http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Variation_Gene/Table](http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Variation_Gene/Table).
- Catalogue of Somatic Mutations in Cancer [database on the Internet]. Available from: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview>
- Moore SW, Zaahl MG. Chasing the ubiquitous RET proto-oncogene in South African MEN2 families: implications for the surgeon. *S Afr J Surg* 2010;48(4):127-31.
- Giannakis M, Hodis E, Jasmine Mu X, Yamauchi M, Rosenbluh J, Cibulskis K, et al. RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. *Nat Genet* 2014;46(12):1264-6.
- Abaan OD, Polley EC, Davis SR, Zhu YJ, Bilke S, Walker RL, et al. The exomes of the NCI-60 panel: a genomic resource for cancer biology and systems pharmacology. *Cancer Res* 2013;73(14):4372-82.
- Attíe T, Pelet A, Edery P, Eng C, Mulligan LM, Amiel J, et al. Diversity of RET proto-oncogene mutations in familial and sporadic Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 1995;4(8):1381-6.
- Garcia-Barceló M, Sham MH, Lee WS, Lui VC, Chen BL, Wong KK, et al. Highly recurrent RET mutations and novel mutations in genes of the receptor tyrosine kinase and endothelin receptor B pathways in Chinese patients with sporadic Hirschsprung disease. *Clin Chem* 2004;50(1):93-100.

36. Chakravarti A. Endothelin receptor-mediated signaling in hirschsprung disease. *Hum Mol Genet* 1996;5(3):303-7.
37. Lindsey SC, Kunii IS, Germano-Neto F, Sittoni MY, Camacho CP, Valente FO, et al. Extended RET gene analysis in patients with apparently sporadic medullary thyroid cancer: clinical benefits and cost. *Horm Cancer* 2012;3(4):181-6.
38. Mulligan LM, Eng C, Attié T, Lyonnet S, Marsh DJ, Hyland VJ, et al. Diverse phenotypes associated with exon 10 mutations of the RET proto-oncogene. *Hum Mol Genet* 1994;3(12):2163-7.
39. Pasini B, Borrello MG, Greco A, Bongarzone I, Luo Y, Mondellini P, et al. Loss of function effect of RET mutations causing Hirschsprung disease. *Nat Genet* 1995;10(1):35-40.
40. Moore SW, Zaahl MG. A review of genetic mutation in familial Hirschsprung's disease in South Africa: towards genetic counseling. *J Pediatr Surg* 2008;43(2):325-9.
41. Romeo G, Ronchetto P, Luo Y, Barone V, Seri M, Ceccherini I, et al. Point mutations affecting the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 1994;367(6461):377-8.
42. Núñez-Torres R, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. A novel study of copy number variations in Hirschsprung disease using the multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA) technique. *BMC Med Genet*. 2009 Nov 19;10:119.
43. Virtanen VB, Pukkala E, Kivisaari R, Salo PP, Koivusalo A, Arola J, et al. Thyroid cancer and co-occurring RET mutations in Hirschsprung disease. *Endocr Relat Cancer* 2013;20(4):595-602.

Germline mutation of RET proto-oncogene's exons 17 and 18 in Iranian medullary thyroid carcinoma patients

Marjan Zarif Yeganeh Ph.D.
Student¹
Samira Kabiri M.Sc.²
Sara Sheikholeslami Ph.D.
Student¹
Hosna Hesanmanesh M.Sc.²
Mehdi Hedayati Ph.D.^{1*}

1- Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences and Metabolism, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Department of Biology, Ahar Branch, Islamic Azad University, East Azerbaijan, Iran.

*Corresponding author: Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 22432500
E-mail: hedayati@endocrine.ac.ir

Abstract

Received: 08 Aug. 2016 Revised: 08 Mar. 2017 Accepted: 17 Mar. 2017 Available online: 18 Mar. 2017

Background: Thyroid carcinoma is the most common endocrine malignancy. Medullary thyroid carcinoma (MTC) approximately accounts for 5-10% of all thyroid carcinoma. Nowadays, it is obviously, the mutations in REarranged during transfection (RET) proto-oncogene, especially, mutations in exons 10, 11 and 16 are associated with MTC pathogenesis and occurrence. Thus, early diagnosis of MTC by mutation detection in RET proto-oncogene allows to identify patients who do not have any developed symptoms. The aim of this study was to screening of germline mutations in RET proto-oncogene exons 17 and 18 in MTC patients and their first degree relatives in Iranian population.

Methods: In this cross-sectional study, three hundred eleven participates (190 patients, 121 their relatives) were referred to endocrine research center, Shahid Beheshti University of Medical Science during September 2013 until September 2015. The inclusion criteria were pathological and clinical diagnosis. After whole blood sampling, genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes using the standard Salting Out/Proteinase K method. Nucleotide change detection in exons 17 and 18 was performed using PCR and direct DNA sequencing methods.

Results: In this study, twenty missense mutations [CGC>TGC, c.2944C>T, p.Arg982Cys (rs17158558)] which included 16 heterozygote and 4 homozygote mutations were found in codon 982 (exon 18). In the present study, 154 G>A (rs2742236) and 4 C>T (rs370072408) nucleotide changes were detected in exons 18 and intron 17 respectively. There was no mutation in exon 17.

Conclusion: It seems that because of arginine to cysteine substitutions in RET tyrosine kinase protein structure and its polyphen score (0.955) and SIFT score (0.01) the mutation in codon 982 (exon 18) could be have pathogenic effects. On the other hands, the mentioned mutation frequency was 6.4% among MTC patients, so this mutation of exon 18 could be checked in genetic screening tests of RET proto-oncogene. Although this needs more study.

Keywords: cross-sectional studies, germline mutation, medullary thyroid carcinoma, RET proto-oncogene.